

氏 名	周 振
学 位 の 専 攻 分 野 の 名 称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	甲理第131号 (文部科学省への報告番号甲第378号)
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	2011年5月18日
学 位 論 文 題 目	Using Surface-enhanced Raman Spectroscopy for Label-free Semi-quantitative Detection of Proteins and Investigation of Adsorption Mechanism of Proteins on Ag Colloid Surface
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 尾 崎 幸 洋 (副査) 教 授 金 子 忠 昭 教 授 山 口 宏 田 和 圭 子 (国内客員准教授)

最近、表面増強ラマン散乱 (Surface-enhanced Raman Scattering ; SERS) が大きな注目を集めている。その最大の理由は、SERS を用いれば、単一の分子からも振動スペクトルの測定が可能であるからである。SERS の応用の中で強い関心を持たれているのは、生物医学への応用である。特に、SERS によるタンパク質の高感度検出が注目されている。すでにこれに関して単一のタンパク質の SERS の報告も行われているが、未だタンパク質の定性分析の段階で、信頼のおける定量分析までには至っていない。実用化には SERS 測定の再現性、金属コロイドの安定性などの問題もある。本論文の申請者は、最近提案された heat-induced SERS-sensing method を初めてタンパク質の定量分析に適用し、定量性、感度、再現性、安定性などの問題について一定の成果を得た。またタンパク質の高感度検出に関連してタンパク質の銀コロイド表面への吸着の問題についても新しい知見を与えている。

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は4つの章から成る。第一章は、硝酸イオンの SERS を用いたタンパク質の Label-free 迅速半定量分析に関するものである。この章では共鳴ラマン効果を示さないタンパク質の検出を Label-free で高感度 (リゾチームについては検出限界 10^{-9} M) で行ったという点が評価される。申請者は、硝酸イオンの 1049cm^{-1} のバンドを選択的に増強できる heat-induced SERS-sensing method を用いている。この方法は、これまでにアミノ酸3個からなるペプチド、グルタチオンについてはすでに適用されているが、タンパク質に適用されるのはこれが初めてである。筆者は、この方法がタンパク質の定量にも適用可能であることを示した。興味深いことに、タンパク質 (リゾチームとインシュリン) の濃度が増大するにつれ、 1049cm^{-1} の SERS 強度は bell shape を示すことがわかった。申請者はその bell shape の理由について、タンパク質と硝酸イオンの吸着の観点から議論した。

第二章は、硝酸イオンの SERS を用いた Label free 半定量タンパク質の検出に対する最適実験条件の検索に関するものである。ここで筆者は、コロイドの大きさ、pH、基板の乾燥温度、銀コロイドの濃度など実験条件を変化させ、SERS 測定と半定量のための最適条件を調べた。その結果、コロイドの大きさ ; 56.5nm 、pH ; 4.0、基板の乾燥温度 ; 100°C などの最適条件を見出した。また銀ナノ粒子のホットスポット形成には硝

酸イオンやタンパク質の濃度が関係する二つのメカニズムがあることを明らかにした。さらに、銀コロイドの安定性および SERS 測定の再現性、安定性についても検討した。

第三章では、筆者は SERS によって観測したタンパク質と硝酸イオンの競争的吸着に関する研究について報告している。タンパク質と硝酸イオンの銀コロイド表面への吸着を研究することは、SERS によるタンパク質検出の高感度化、再現性の向上等にとって非常に重要なことである。この研究により筆者は、タンパク質と硝酸イオンの銀コロイドへの競争的吸着は、タンパク質や硝酸イオンの濃度さらには基板の乾燥温度などの実験条件を変えることにより、制御可能であることを明らかにした。またタンパク質の吸着はタンパク質のコンフォメーションによっても変化することが分かった。さらに、試料の準備の中でタンパク質と硝酸イオンを加える順序は、最終的な吸着の結果に影響を及ぼさないことも明らかにしている。

第四章では、筆者は、2 種類のタンパク質の混合物の SERS について述べている。2 種類のタンパク質がともに発色団を持つもの、2 種類のタンパク質がともに発色団を持たないもの、2 種類のタンパク質のうちの 1 種類が発色団を持ち、もう 1 種類が発色団を持たないものについて、heat-induced SERS-sensing method を用いて SERS を測定した。その結果、2 種類のタンパク質がともに発色団を持つもの、ともに発色団を持たないものについては硝酸イオンの SERS 強度は、濃度にほぼ比例して強くなるのに対し、1 種類が発色団を持ち、もう 1 種類が発色団を持たないものについては“bell shape”型の変化がみられることを見いだした。1 種類が発色団を持ち、もう 1 種類が発色団を持たないものの場合、観測されるバンドは大方発色団を持つものによるバンドであるが、発色団を持たないタンパク質も濃度依存性には大きな影響を与えていることが明らかになった。この研究から、タンパク質の混合物の SERS スペクトルはかなり複雑でタンパク質の種類だけでなく、大きさ、形などによっても変わりうるということが明らかになった。

論文審査結果の要旨

本論文は、最近注目を集めている表面増強ラマン散乱 (Surface-enhanced Raman Scattering ; SERS) によるタンパク質の高感度検出に関するものである。タンパク質の高感度検出に関しては、すでに単一分子のタンパク質の SERS の報告も行われているが、実用化には SERS 測定の再現性、定量性、金属コロイドの安定性などの問題もある。本論文の著者はタンパク質の SERS の感度、再現性、定量性、安定性などについて新しい知見を得、SERS によるタンパク質の高感度検出の研究を大きく前進させた。

本論文の重要な寄与、結論は以下の通りである。

- 1) 最近提案された heat-induced SERS-sensing method を初めてタンパク質の定量分析に適用し、この方法を用いれば、Label-free、非共鳴の条件下でタンパク質の定量を検出限界 10^{-9} M で行えることを示した。またこの方法を用いた Label-free 半定量タンパク質分析に対する最適実験条件を決定した。
- 2) Heat-induced SERS-sensing method ではタンパク質の濃度が上昇するにつれ硝酸イオンの SERS 強度が強くなるが、ある一定濃度を超えると逆にそれが弱くなることがあることを見出した。濃度変化に伴う SERS バンドの強度変化が、ちょうど“bell shape”になる。筆者は bell shape となる理由について、タンパク質と硝酸イオンの吸着の観点から議論した。これは非常に興味深い現象で、この現象のさらなる機構解明は、タンパク質の銀コロイドへの吸着の問題に新しい知見を与える可能性がある。
- 3) SERS によるタンパク質の高感度検出に関連し、銀ナノ粒子のホットスポット形成、銀コロイドへのタンパク質の吸着について研究した。その結果、銀ナノ粒子のホットスポット形成にはタンパク質と硝酸イオンの相対濃度が関係する 2 種類のメカニズムがあることを明らかにした。またタンパク質と硝酸イオンの銀コロイド上への競争的吸着は、タンパク質、硝酸イオンの濃度や基板の乾燥温度などの実験条件によって制

御できることも見出した。

本論文の内容はすでに3編の論文として Chem.Lett., Analyst, J.Raman Spectrosc. に発表されている。さらに1編の論文が投稿中となっている。審査委員は本論文の内容を中心に面接と公開の論文発表会を行い、著者が論文内容と用いた技法について十分な理解とともに関連する分野についても学識を有し、また将来の研究遂行に対しても十分な能力を持つことを確認することが出来た。以上のことより、審査委員会は本論文の著者が博士（理学）の学位を授与されるに足る十分な資格を有するものと判定する。